

• 论 著 •

潮汕地区人群 CYP2C9 基因多态性研究

胡 婧,肖瞳瞳,潘美晨,张悄忻,程碧珍,蔡应木[△]
(汕头大学医学院第一附属医院检验科,广东汕头 515041)

摘要:目的 了解细胞色素 P450 家族 CYP2C9 基因多态性在潮汕地区人群分布的情况,以及基因型分布和基因突变率。**方法** 采用 DNA 测序法检测 204 例当地健康志愿者 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 的基因多态性。**结果** 204 例志愿者 CYP2C9 基因型检测有 184 例为 * 1 / * 1 型,19 例为 * 1 / * 3 型,1 例为 * 3 / * 3 型,频率分别为 90.19%、9.31% 和 0.50%,未发现 * 1 / * 2、* 2 / * 2 和 * 2 / * 3 型突变;CYP2C9 * 3 的突变率在男女之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CYP2C9 基因在潮汕地区的多态性分布和性别有关,根据基因型的差异进行个体化用药有利于临床治疗。

关键词: CYP2C9; 基因多态性; 序列分析**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.018 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)19-2864-03

Study of CYP2C9 gene polymorphism among population in Chaoshan area

HU Jing, XIAO Tongtong, PAN Meichen, ZHANG Qiaoxin, CHENG Bizhen, CAI Yingmu[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution situation of CYP2C9 gene polymorphism among population in Chaoshan area, and gene type distribution and gene mutation frequency. **Methods** The sequencing method was used to detect CYP2C9 * 2 and CYP2C9 * 3 gene polymorphism in 204 local healthy volunteers. **Results** Among detected 204 volunteers, 184 cases of CYP2C9 * 1 / * 1, 19 cases of CYP2C9 * 1 / * 3, and only 1 case of CYP2C9 * 3 / * 3 were detected, no case of CYP2C9 * 1 / * 2, CYP2C9 * 2 / * 2 and CYP2C9 * 2 / * 3 mutation was detected. The CYP2C9 * 3 mutation rate had statistical difference between male and female ($P < 0.05$). **Conclusion** The polymorphism distribution of CYP2C9 gene is related to gender in Chaoshan area, and the personalized medication according to genotype difference is conducive to clinical therapy.

Key words: CYP2C9; gene polymorphism; sequence analysis

CYP2C9 基因是细胞色素 P450 (CYP-450) 酶系家族成员之一,是人体内药物代谢的主要酶,富含在人体肝脏微粒体中^[1]。CYP2C9 基因所在的亚家族 CYP2C 是目前研究最广泛,最深入的细胞色素亚家族之一,主要由 CYP2C8、CYP2C9、CYP2C17、CYP2C18 和 CYP2C19 等基因的多态性组成。

P450 家族基因的表达水平及其编码的酶活性受遗传变异的影响,基因突变可能导致酶底物的药物动力学发生明显改变。药物代谢的减慢将导致血液中药水平过高,从而产生不良反应至治疗无效^[2]。根据细胞色素酶 P450 家族的活性,个体的表型可以划分为慢代谢型、中间代谢型、快代谢型或超快代谢型。快代谢型指野生型纯合子,中间代谢型携带 1 个等位基因突变,慢代谢型携带 2 个等位基因突变,而超快代谢型常携有多个拷贝的活性等位基因。

CYP2C9 基因位于人类染色体 10q24.2 上,全长约 50 kb,有 9 个外显子和 8 个内含子^[3]。目前已发现 CYP2C9 存在 CYP2C9 * 2~CYP2C9 * 35 多种突变等位基因,其中以突变型 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 最为常见,也是目前研究最多的突变型,与野生型 CYP2C9 * 1 相比,其酶活性明显降低。有研究表明,突变型 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 可使华法令在个体用药剂量的差高达 12%^[4]。其他突变型除 CYP2C9 * 13 外,均只在单一民族中发现,相关研究较少^[5]。

作为临床上常用的口服抗凝药物,华法令的药物代谢速度

主要受基因 CYP2C9 和 VKORC1 的影响^[6]。CYP2C9 负责药理活性强的 S 型华法令的代谢,而 VKORC1 为华法令的靶蛋白,华法令通过抑制 VKORC1,从而减少影响羧化作用和激活凝血因子的一个必要的辅助因子维生素 K^[7]。

突变型 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 与野生型相比,编码的酶活性降低,并且其代谢底物药的能力也明显降低,因此携带突变基因对患者的药物清除率明显下降。因为药物半衰期的延长,会导致患者在接受治疗时容易发生不良反应,尤其是华法令这种治疗指数较窄的底物药,容易造成出血或血栓的风险。本文检测潮汕人群 CYP2C9 基因多态性,将为潮汕地区人群的华法令个体化用药提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本地高中生志愿者 204 例作为研究对象,其中男 87 例,女 117 例,年龄 12~17 岁。采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管采集外周血 2~3 mL。标本采集均取得志愿者知情同意,且获院医学伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 全血 DNA 快速提取试剂盒[亚能生物技术(深圳)有限公司];引物(上海生工生物工程股份有限公司);Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye)、DL2000 DNA Marker[宝生物工程(大连)有限公司];聚合酶链反应(PCR)仪(凯普 BYQ6506E);电泳仪(贝瑞 DY-600);核酸蛋白凝胶图像分析系统(HEMA GSG-2000)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计 通过美国国立生物技术信息中心对 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 这 2 个突变位点单核苷酸的多态性(SNP)的信息进行查询,调取包含突变位点的核酸序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计用于电泳测序的引物。最终选定的 CYP2C9 * 2 上游引物 5'- AAG TTT GCA TAT ACT TCC AGC ACT-3'及下游引物 5'-ACC CGG TGA TGG TAG AGG T-3';CYP2C9 * 3 上游引物 5'-GTT GGT CTA CAG CCT CTG CTA TAC A-3'及下游引物 5'-AGG GTT GTG CTT GTC GTC TCG G-3'。

1.3.2 全血 DNA 的提取 首先用裂红液裂解红细胞,收集白细胞,然后通过变性液使蛋白质变性释放 DNA,在高盐低 pH 的条件下利用 DNA 吸附剂吸附 DNA,洗涤杂质,最后用低盐高 pH 的溶液溶解 DNA。

1.3.3 PCR 扩增及产物的电泳鉴定 用 Premix Taq PCR 液进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:98 ℃ 10 s;60 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,32 个循环。PCR 扩增反应结束后,将产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,根据 PCR 产物的大小,初步检测 PCR 的特异性。为防止 PCR 扩增过程中操作及实验室污染,PCR 前处理和后处理及检测均按原卫生部 PCR 检测规范操作。

1.3.4 SNP 位点检测 将扩增的特异性强的 PCR 产物送至生工生物工程公司进行一代 DNA 测序。再根据测序结果和峰值图谱进行突变位点的碱基比对,进行基因分型。

1.4 统计学处理 采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,由基因型频率计算等位基因频率,确定该标本人群符合 Hardy Weinberg 遗传平衡。采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DNA 测序法检测基因突变结果 将选取的 204 例标本,经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳分析,挑选特异性强和灵敏度高的标本送至上海生工生物工程公司测序。测序结果中未发现 CYP2C9 * 2 突变型,而 CYP2C9 * 3(A>C)多态位点,杂合子突变型和纯合子突变型均有检测出。见图 1、2。

TCCAGAGATACCTTGACCTTCTC

图 1 CYP2C9 * 1/ * 3 杂合子多态位点测序峰形图

TCCAGAGATACCTTGACCTTCTC

图 2 CYP2C9 * 3/ * 3 纯合子多态位点测序峰形图

2.2 CYP2C9 基因型和等位基因频率 对测序结果进行分析,CYP2C9 * 2 未发现杂合子或者纯合子基因突变,即 CYP2C9 * 1/ * 2、CYP2C9 * 2/ * 2、CYP2C9 * 2/ * 3 基因型在本研究所选取的人群中均未检出。而 CYP2C9 * 3 突变型中,发现 19 例中间代谢型突变基因(CYP2C9 * 1/ * 3),见表 1,该基因多态位点的突变率在男女人群间的分布差异有统计学意义($P=0.036$)。CYP2C9 * 3 多态位点基因为 A>C,其中 AA、AC、CC 的基因频率分别为 0.902、0.903、0.005,等位基因 A 和 C 频率为 0.949 和 0.051。经 Haroly Weinberg 遗传平衡公式计算,该标本符合平衡定律。

表 1 不同性别 CYP2C9 各基因型检出结果[n(%)]

组别	n	*1/ *1	*1/ *2	*1/ *3	*2/ *2	*2/ *3	*3/ *3
男性	87	81(93.10)	0(0.00)	6(6.90)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
女性	117	103(88.03)	0(0.00)	13(11.11)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.90)
合计	204	184(90.19)	0(0.00)	19(9.31)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.50)

3 讨 论

本研究的结果表明,在潮汕地区健康人群中,出现频率较高的基因型为快代谢型(CYP2C9 * 1/ * 1)、中间代谢型(CYP2C9 * 1/ * 3)和慢代谢型(CYP2C9 * 3/ * 3),频率分别为 90.19%、9.31%和 0.50%,而等位基因 CYP2C9 * 2 均为快代谢型,未检出其中间代谢型(CYP2C9 * 1/ * 2)和慢代谢型(CYP2C9 * 2/ * 2)。有研究表明,CYP2C9 * 3 突变型患者能解释 7% 的华法令个体剂量差异^[8]。有关浙江省和河北省的健康汉族人群的研究表明,在出现频率较高的等位基因 CYP2C9 * 3 突变中,中间代谢型(CYP2C9 * 1/ * 3)和慢代谢型(CYP2C9 * 3/ * 3)出现频率分别为 5.36%和 0.24%,中间代谢型和慢代谢型对 S 型华法令的清除率只有快代谢型(CYP2C9 * 1/ * 1)的 90.00%和 60.00%^[1]。有关湖北省房颤患者 CYP2C9 基因型的研究表明,CYP2C9 基因 * 1/ * 1 型为 93.62%, * 1/ * 3 型为 6.38%,CYP2C9 * 2 基因突变型在亚洲人群中少见或缺失^[9]。本研究的 CYP2C9 基因突变率在男女中差异有统计意义($P<0.05$),这与已有的华南地区的数据保持一致^[10],但也有研究报道这与性别差异并无统计学意义($P>0.05$)^[11]。由于不同地区和种族的 CYP2C9 基因多态性差异,对其相关代谢底物,如华法令、苯妥英钠、甲苯磺丁脲和许多非甾体类抗炎药等药物代谢能力存在明显的人群和地域差异。因此,在不同种族或者地域人群中,关于该基因的多态性研究对于理解与其相关药物的临床用量差异极其重要,并且可以根据患者间的基因分型差异,更好地指导个体化用药^[12]。

药物基因组学及相关基因多态性在影响药物的合理使用和个体化用药上具有重要意义,作为 CYP2C9 基因的典型代谢药物,华法令的治疗指数相当狭窄,药物的剂量需要通过凝血功能检测值进行调整。然而,基因型作为治疗初期华法令初始剂量的主要决定因素,可以有效地指导药物剂量以减少患者出血与血栓的风险。随着检测技术的日益更新与完善,基因分型的检测在指导个体化用药方面将扮演越来越重要的角色。

参考文献

[1] 刘跃平,杨翔,徐含青,等. CYP2C9、VKORC1 基因多态性与华法令个体化用药研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2015,40(2):163-168.

[2] 郑琪. CYP2C9 和 VKORC1 基因多态(下转第 2868 页)

因此早期的预防工作十分有必要。有研究提出微血栓的形成及内皮细胞的损伤是患者发生重症中暑的重要因素^[9]。机体在高温状态下迅速失水,致使血液黏滞度增加,也是导致血栓形成的原因之一^[10]。而且高温会导致人体细胞出现缺氧、高代谢等系列改变,进而损伤血管内皮细胞,增加促凝因子的产生。高温状态还会影响温度调节中枢,扩张皮肤血管,在内脏血管处于收缩的状态下,造成肠道缺血状态而增加肠道通透性,使内毒素水平增加而加重患者的凝血障碍。

有研究发现,热应激可激活血小板而引发凝血异常,中暑发生后同时带来的机体高温、缺氧应激状态还会促使炎症介质和氧自由基的大量产生释放,诱导炎性级联反应的发生^[11]。炎症反应又会加重凝血系统的功能异常,而凝血反应的发生同时也会加重炎症反应。有试验对高温导致的热应动物进行检查发现,在其心、肝、肾、肺、脑、肠等多脏器出现广泛的微血栓。因此有学者认为,重症中暑凝血异常往往是患者脏器功能发生衰竭的先兆^[12]。

重症中暑患者若出现凝血异常,随之而来的则是消化道甚至脑出血等危急状况。抗凝治疗对于减缓脏器功能损伤、修复凝血抗凝平衡和阻碍 DIC 病理进程具有重要意义。因此,对于重症中暑患者的早期治疗措施除了迅速降温之外,还可以进展使用低分子肝素进行抗凝干预^[13]。本研究中重症中暑患者治疗前 D-二聚体和相关凝血指标处于异常高水平,提示患者可能存在低纤溶活性和高抗凝活性状态。本研究提示对重症中暑患者早期应用低分子肝素,安全有效,能明显改善患者凝血功能。本研究样本例数较少,需后期加大样本量,进行深入研究。

参考文献

- [1] 童华生,段鹏凯,张兴钦,等.重症中暑大鼠肠系膜淋巴微循环变化[J].解放军医学杂志,2014,39(4):329-332.
- [2] 曹才文,何旋,李莉,等.重症中暑早期肠黏膜屏障功能损害与全身炎症反应的相关性研究[J].中华危重病急救医学,2016,28(4):303-307.
- [3] Afshari D, Moradian N, Nasiri FA, et al. The efficacy and safety of low-molecular-weight heparin and unfractionated heparin in the treatment of cerebral venous sinus thrombosis[J]. Neurosciences, 2015, 20(4): 357-361.
- [4] 陈恂,童华生,张兴钦,等.乌司他丁减轻重症中暑大鼠肺的炎症和氧化损伤[J].中华急诊医学杂志,2014,23(8): 866-870.
- [5] 王国祥,王玺,王平,等.低分子肝素治疗对老年重症肺炎患者 APACHE II 评分及动脉血气分析参数的影响[J].中国感染控制杂志,2014,13(1):16-19.
- [6] 郭夏飞,沈军,李妍.三种剂量低分子肝素联合甲强龙对难治性肾病综合征患者高凝状态及肾功能的影响[J].中国生化药物杂志,2016,36(9):125-128.
- [7] 张立新,陶红,李景荣.重症中暑并发肝损害的临床分析[J].安徽医科大学学报,2014,49(12):1822-1824.
- [8] 朱亚丽,徐琴,孙岚,等.集束化护理在重症中暑患者急救中的应用[J].中华现代护理杂志,2015,21(6):700-702.
- [9] 俞建峰,刘文明,蒋建红,等.乳酸代谢及乳酸清除率对重症中暑患者预后的评估价值[J].实用临床医药杂志,2015,19(23):44-47.
- [10] 周尧英,王志娟,林艳红,等.集束化护理对重症中暑患者干预的效果评价[J].中华全科医学,2014,12(12):2026.
- [11] 于琳琳.集束化护理用于重症中暑患者急救中的护理效果评价[J].实用临床医药杂志,2016,20(8):34-36.
- [12] Afshari D, Moradian N, Nasiri FA, et al. The efficacy and safety of low-molecular-weight heparin and unfractionated heparin in the treatment of cerebral venous sinus thrombosis[J]. Neurosciences, 2015, 20(4): 357-361.
- [13] 邓凯军,刘淮柱.职业性重症中暑死亡 1 例分析[J].环境与职业医学,2014,31(1):63-64.

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-07)

(上接第 2865 页)

- 性指导房颤患者华法令初始抗凝的研究[D].福州:福建医科大学,2014.
- [3] 陈琿,蔡泓敏,冯端浩,等.CYP2C9 和 CYP2C19 基因多态性对药物代谢的影响及个体化用药研究进展[J].中国药物应用与监测,2014,11(4):240-244.
- [4] 孙雪,况赞,阳喜定,等.论华法令相关基因突变检测技术[J].分子诊断与治疗杂志,2015,7(3):199-204.
- [5] Yip VL, Pirmohamed M. Expanding role of pharmacogenomics in the management of cardiovascular disorders[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2013, 13(3): 151-162.
- [6] 牛国平,魏园园. CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法令剂量关系的研究[J]. 检验医学, 2014, 29(6): 635-639.
- [7] Julie A, Johnson, Pharm D, et al. Warfarin pharmacogenetics[J]. Trends Cardiovasc Med, 2015, 25(1): 33-41.
- [8] 张海燕,罗万慰,方焕荣,等. VKORC1, CYP2C9, CYP4F2,

- EPHX1 基因多态性对华法令剂量的影响[J]. 中国药房, 2012, 23(34): 3201-3205.
- [9] 黄爱霞,乔斌.湖北地区房颤患者 VKORC1, CYP2C 基因多态性及其对华法令用量的影响[J].微循环学杂志, 2014, 24(4): 44-48.
- [10] 刘美玲,张东梅,罗娥.华南地区汉族人群心脑血管相关基因多态性分析[J].检验医学与临床,2016,13(9):1169-1171.
- [11] 陈晖,马蕾. CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法令个体化用药的临床研究[J].中国实用医药,2015,10(12):3-5.
- [12] 朱均,黄国庆,王璐,等.广东人群药物代谢酶 CYP2C9 基因 374G>A 位点多态性调查[J].广东药学院学报,2013,29(5):536-538.

(收稿日期:2017-01-19 修回日期:2017-03-18)